

09 / 50 84356

PCT/JP98/04063

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

10.09.98

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1997年 9月11日

REC'D 30 OCT 1998

WIPO

PCT

出 願 番 号

Application Number:

平成 9年特許願第246684号

出 願 人

Applicant (s):

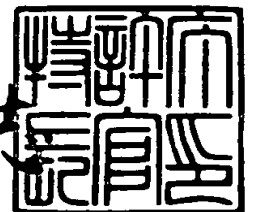
塩野義製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1998年10月16日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平10-3082199

【書類名】 特許願

【整理番号】 156820

【提出日】 平成 9年 9月11日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/53
C07K 14/00

【発明の名称】 B N P の免疫測定法

【請求項の数】 7

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府高槻市南平台 5-23-5

 【氏名】 浅田 英久

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県神戸市長田区御屋敷通 3-1-2 サンタウン御
屋敷 709号

 【氏名】 清水 洋行

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府高槻市南平台 3-5-18

 【氏名】 遠藤 三朗

【特許出願人】

 【識別番号】 000001926

 【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町三丁目 1 番 8 号

 【氏名又は名称】 塩野義製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100062144

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 青山 葆

【選任した代理人】

 【識別番号】 100068526

 【弁理士】

【氏名又は名称】 田村 恭生

【選任した代理人】

【識別番号】 100087114

【弁理士】

【氏名又は名称】 齋藤 みの里

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013262

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9714242

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 BNPの免疫測定法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 哺乳類の γ -BNP誘導体に特異的な免疫測定法であって、該誘導体に反応する抗体のうち、プレプロBNPもしくは γ -BNPを、そのプロセッシングシグナル配列のカルボキシ末端で切断することにより生成されるナトリウム利尿活性を有する低分子量の α -BNPに反応する第1の抗体と、反応しない第2の抗体とを用いることを特徴とする方法。

【請求項2】 γ -BNP誘導体が、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列における、アミノ酸番号73-102で示される部分アミノ酸配列を包含するものである請求項1記載の方法。

【請求項3】 第2の抗体が、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号73-102で示されるアミノ酸配列に特異的な抗体である請求項2記載の方法。

【請求項4】 第1の抗体および第2の抗体のうち、少なくとも一方が検出可能に標識されていることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 検出可能な標識が放射性同位体、酵素、蛍光物質、発光物質又は粒子である請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 哺乳類の γ -BNP誘導体に特異的な免疫測定のためのキットであって、該誘導体に反応する抗体のうち、プレプロBNPもしくは γ -BNPを、そのプロセッシングシグナル配列のカルボキシ末端で切断することにより生成されるナトリウム利尿活性を有する低分子量の α -BNPに反応する第1の抗体と、反応しない第2の抗体とを含むことを特徴とするキット。

【請求項7】 第1の抗体および第2の抗体のうち、少なくとも一方が検出可能に標識されており、該標識を検出する手段とを含むことを特徴とする請求項6記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ナトリウム利尿ペプチドファミリーの1つである脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)の免疫測定法に関し、さらに詳しくは、プロBNP(以下、 γ -BNPという)及びその誘導体の免疫測定法に関する。

【0002】

【従来技術と発明が解決すべき課題】

ナトリウム利尿ペプチドファミリーには、心房性(ANP)、脳性(BNP)及びCタイプ(CNP)の3種のリガンドが含まれており、それらのうち、前2者は、主として心臓で生合成され、分泌される心臓ホルモンである。ANPとBNPは構造上、極めて類似しており、ANPは28アミノ酸からなり、第7及び第23位のシステイン、BNPは32アミノ酸からなり、第10及び第26位システインの間でジスルフィド結合が形成されたリング部分を有し、活性の発現には、少なくともこのリング部分が必要であると考えられている。また、これらの28及び32アミノ酸からなる成熟ペプチドは、細胞内で、又は細胞からの分泌に際してそれぞれの前駆体から切り離されて生成すると考えられていた。即ち、従来、ヒトBNPは、心筋細胞中でプレプロホルモン(以下、プレプロBNPという)として産生され、分泌前又は分泌に際してSer26-His27間で開裂され、プロBNP(以下、 γ -BNPという)となった後にArg102-Ser103の間で開裂され、BNP32(以下、 α -BNPという)とBNP(1-76)になり、前者が活性を示すと報告されていた。

【0003】

心臓ホルモンの分泌は様々な心疾患により刺激されるが、ANPの分泌が主に心房への負荷で亢進されるのに対して、BNPは心室への負荷で生合成、分泌が亢進されるような心機能の変化を反映している。従って、ANP及びBNPは、共に心疾患の診断の指標として有用であるが、それぞれの作用機構が解明されるにつれて、BNPを指標とすることの利点が明らかにされてきた。例えば、正常な血中濃度を比較するとBNPはANPの6分の1の濃度にすぎないが、心不全

などの場合には、ANPよりも血中濃度が高くなること、心不全の症例で、血中BNP濃度はANP濃度とともに上昇するが、重症例ほどBNP優位となる例が多いこと、末梢血レベルでの血漿ANP、BNP濃度は心不全の重症度に伴い増加するが、BNPの増加の程度はANPを上回っていることなどである。しかも、心不全症例でのBNP値は健常者の数十倍～数百倍に増加することもあり、心不全におけるBNPの変動は他のホルモンに類を見ないほど顕著であることから、BNP測定の有用性が示唆されてきた（斎藤能彦ほか、Mebio, 12(5), 28, (1995)）。

【0004】

このような状況下、心不全の診断に役立てることを目的としてBNP抗体を用いる免疫アッセイが提供された（特表平7-507210）が、この方法では、BNP活性発現に必要な部位に対する抗体を用いていないため、プロテアーゼなどで分解された γ -BNPや γ -BNP（1-76）などを測定するため、ホルモン活性を測定することにより心不全等を正確に診断することが要求されるBNP測定法として、信頼性が疑われる。

また、ナトリウム利尿活性を有する α -BNPを測定する方法においても、ポリクローナル抗体を用いた測定方法（「BNP-32」：ペニンシュラ社製）では、分泌後、分解を受けてC末端などが欠損し、活性を失った α -BNP分解物にも反応することから、心不全等を正確に診断することが要求されるBNP測定法として、信頼性が疑われる。

一方、これらの点を考慮した活性発現に必要な構造を認識する抗体を用いたBNP測定法（「シオノリアBNP」：塩野義製薬社製）においては、 α -BNPが採血後、血中で極めて不安定であることから、検体の採血方法、保存方法並びに測定までの時間が測定結果に大きく影響するために、安定で信頼性あるデータを得るには、採血管に分解抑制剤を添加したり、検体を低温に保つなど、特別な処理が必要であり、臨床応用への障害となっていた。また、正確な値を得られない恐れもあった。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、BNPが関与する心疾患の正確な診断法を確立するために研究を重ねる過程で、血中でのBNPの形態は、従来考えられていた α -BNPとしてでなく、主として、 γ -BNP及び少なくとも構造上 α -BNPを含む γ -BNP分解物（以下、これらを γ -BNP誘導体という）で構成されていることを見出した。また、血中において、 γ -BNPは α -BNPよりも安定であること、即ち、 γ -BNPのN-末端構造の役割の1つがBNP分子の安定化であることを見出した。これらのことから、生体は、半減期の異なる少なくとも2種類のBNP活性を有するBNP分子を生合成していると考えられた。このような知見を得て、本発明者らは、心疾患の正確な診断のためには、 α -BNPのみならず、 γ -BNP誘導体などのBNP関連物質を特異的に測定する必要があるとの見解に達し、本発明を完成した。

【0006】

即ち、本発明は、哺乳類の γ -BNP誘導体に特異的な免疫測定法であって、該誘導体に反応する抗体のうち、 γ -BNPもしくはプレプロBNPを、そのプロセッシングシグナル配列のカルボキシ末端で切断することにより生成されるナトリウム利尿活性を有する低分子量の α -BNPに反応する第1の抗体と、反応しない第2の抗体とを用いることを特徴とする方法を提供するものである。

【0007】

本明細書中、「哺乳類の α -BNP」とは、哺乳類のプレプロBNPまたは γ -BNPのプロセッシングシグナル配列のカルボキシ末端からプロセスされ、N-末端側のペプチドを分離することにより生成されるナトリウム利尿活性を有する低分子量のペプチドを指す。 α -BNPは、ヒトの場合、配列番号1の配列表におけるカルボキシ末端側32アミノ酸（第103-134位）からなり、環状構造を有するペプチドである。プレプロBNPのプロセッシングシグナル配列のカルボキシ末端の位置は、種により若干異なり、例えば、ヒトBNPの場合、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列における第102位のアミノ酸Arg、ブタおよびイヌでは第100位のアミノ酸に相当する。

「哺乳類の γ -BNP」とは、カルボキシ末端に α -BNPに相当する32アミノ酸ペプチド部分を有し、ヒトの場合には、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の27位Hisから134位Hisまでの108アミノ酸からなる。

「哺乳類の γ -BNP誘導体」とは、哺乳類のプレプロBNP又は γ -BNPから、主としてプロテアーゼ作用により生成される、 α -BNPを含み、該 α -BNPよりも大きいペプチド断片を指す。それは、通常、 γ -BNPよりも小さいが、それよりも大きい断片が含まれていてもよい。本明細書中では、特記しない限り、「 γ -BNP誘導体」という場合、 γ -BNP自身も該誘導体に包含される。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明の測定対象である γ -BNP誘導体は、ヒトの場合、少なくとも、配列番号1のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号73-134で示される部分アミノ酸配列を包含することが好ましい。その理由は、実験の結果が、 γ -BNPのプロテアーゼによる切断可能部位の内、該配列番号1の第47位のArg、53位のLysおよび72位のArgで切断された誘導体の存在を示唆しており、第73位のアミノ酸の下流に存在するプロテアーゼ切断部位で切断された誘導体の存在は示唆していないことにある。即ち、検体のゲルろ過クロマトグラフィー分画の α -BNP測定法の結果から、 α -BNP及び γ -BNP誘導体のピークが鋭敏に分離されていることから、 γ -BNP誘導体は α -BNPと比べて分子量は大きく、第73位より下流で切断された γ -BNP誘導体は存在しないか、又は存在しても微量であると予測される（図1及び3参照）。

【0009】

本発明において、BNPに関して、「安定である」とはプロテアーゼによる分解を受けるが、少なくともカルボキシ末端側のリング構造とC末端が存在し、ナトリウム利尿活性を有しており、採血後24時間経過してもナトリウム利尿活性に有意な減少は見られない状態であることを意味する。この定義に照らして、本発明の測定対象である γ -BNP誘導体は安定である。

一方、不安定であるとは、プロテアーゼなどによりC末端が分解を受け、採血

後24時間経過すればナトリウム利尿活性に有意な減少が見られる状態を意味し、この定義に照らして、 α -BNPは不安定である。

【0010】

本発明方法の第1の態様として、本発明方法では、 γ -BNP誘導体に反応する抗体のうち、 α -BNPに反応する第1の抗体と、反応しない第2の抗体とを用いる。

この方法において使用する抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれでもよく、第1の抗体としてはペプチド研究所などから販売されているもの、又は化学的の合成したヒト α -BNPもしくはその部分ペプチドを免疫原として当業者既知の方法で製造することができる。或いは、市販の α -BNP測定キット「シオノリアBNP」（塩野義製薬社製）に用いられている α -BNPカルボキシ末端部分に反応するモノクローナル抗体を用いることができる。

また、第2の抗体としては、上記の条件を満たす任意の抗体を用いることができるが、例えば、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号73-102で示されるアミノ酸配列に特異的な抗体であることが好ましい。そのような抗体の製造も、当業者既知の方法で行うことができる。

【0011】

本発明の測定法は、競合法又はサンドイッチ法のいずれでもよく、用いる抗体はモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれでもよい。

さらに、第1の抗体および第2の抗体のうち、少なくとも一方が検出可能に標識されていてもよい。

抗体の標識及び固定化も当業者に既知である。標識としては、放射性同位体、酵素、蛍光物質、発光物質又は粒子等を用いることができるが、これらに限定されない。抗体の標識法も既知であり、例えば、河野ら（核医学技術、13(1), 2, (1993))の方法により標識することができる。

【0012】

本発明はまた、哺乳類の γ -BNP誘導体に特異的な免疫測定のためのキットであって、該誘導体に反応する抗体のうち、 γ -BNPもしくはプレプロBNPを、そのプロセッシングシグナル配列のカルボキシ末端で切断することにより生

成されるナトリウム利尿活性を有する低分子量の α -BNPに反応する第1の抗体と、反応しない第2の抗体とを含むことを特徴とするキットを提供するものである。

【0013】

本発明のキットは、競合法又はサンドイッチ法のいずれでもよく、用いる抗体はモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれでもよい。

第1の抗体及び第2の抗体のうち、少なくとも一方が検出可能に標識されており、該標識を検出する手段を含んでいてもよい。該標識としては、放射性同位体、酵素、蛍光物質、発光物質又は粒子を用いることができるが、これらに限定されない。

以下に実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明はこれら実施例により限定されるものではない。

【0014】

実施例1 サンドイッチIRMA法による γ -BNPの測定

以下の実施例において、一般の試薬は和光純薬社またはナカライテスク社の特級試薬を使用した。牛血清アルブミン(BSA)はシグマ社製を使用した。

(1) 血漿検体の調製

1) 心疾患患者もしくは健常人ボランティアから牛肺由来アプロチニン(シグマ社製)(500KIU/L)添加EDTA採血管に静脈血を採取し、4℃、 \times 2000gで5分間遠心分離(コクサン社製H-107RGA)し、血球分離を行った。なお、試験例1に使用する健常人ボランティアからの採血は牛肺由来アプロチニン未添加のEDTA採血管を用い静脈血を採取し、同様の操作により血漿検体を得た。得られた血漿検体は使用するまで-80℃で凍結保存した。

【0015】

2) 上記1)で保存した心疾患患者及び健常人由来の血漿をゲルろ過HPLCシステムLC10A(島津製作所社製)にSuperdex75 10/30カラム(ファルマシア社)を用いて分画した。0.1Mりん酸緩衝液(pH7.5、0.3M NaCl、5mM EDTA)を用い、流速1ml/minでカラムを平衡化した後、血漿検体1mlを注入し、カラムからの溶出液1mlづつを分画する。各分画を用い

、下記(2)、2)の γ -BNP測定法及び(2)、3)の α -BNPの測定法に従い、それぞれ測定を行った。

【0016】

(2) γ -BNP測定系及び α -BNP測定系

1) 測定には、以下のペプチド、抗体及びキットを用いた。

- ・ヒト α -BNP (ペプチド研究所社製)
 - ・ γ -hBNPアミノ末端部分(配列番号1におけるアミノ酸番号27-64)に対する抗体(ペプチド研究所社製)
 - ・ α -BNPカルボキシ末端部分に対するモノクローナル抗体(BC203)
- 。BC203はシオノリアBNPキット(塩野義製薬社製)に添付されている α -BNPのカルボキシ末端(129-134)に対するモノクローナル抗体であり、ビーズに固定化されており、固定化抗体として用いる。
- ・ α -BNPリング構造部分に対するモノクローナル抗体(KY-BNPII)
- 。KY-BNPIIはシオノリアBNPキット(塩野義製薬社製)に添付されている α -BNPのリング構造(112-128)に対するモノクローナル抗体であり、 ^{125}I で標識されている。

【0017】

2) γ -hBNPアミノ末端部分(27-64位)に対する抗体の ^{125}I による標識は、以下のようにして行った。

γ -hBNPアミノ末端部分(配列番号1のアミノ酸番号27-64部分)に対する抗血清(ペプチド社製)からMASPIIキット(バイオラッド社製)を用いてIgGを精製し、セントリコン30(アミコン社製)を用いて0.5Mリン酸緩衝液(pH7.5)に置換した。抗体標識はクロラミンT法を用いて行った。精製IgG溶液170 μl (77.6 μg IgG)をガラスチューブに分注し、Na ^{125}I 溶液(アマシャム社製)を10 μl (34.2MBq)添加した。0.1%クロラミンT溶液20 μl を添加し、室温で30秒間激しく攪拌した後、0.25%ピロ亜硫酸ナトリウム溶液及び5%よう化カリウム水溶液をそれぞれ20 μl ずつ加えて反応を停止した。Ampure SAカラム(アマシャム社製)により未反応の ^{125}I の除去および脱塩を行い、 ^{125}I 標識抗体を得た。

【0018】

3) α -BNP測定系による血漿画分の測定

α -BNP測定法には市販の「シオノリアBNPキット」(塩野義製薬社製)を用いた。この系では、 α -BNPのリング構造に対するモノクローナル抗体(KY-BNPII)およびカルボキシ末端に対するモノクローナル抗体(BC203)を用い、供給者の指示に従い、サンドイッチIRMA法で測定する。

すなわち、各測定検体及び各種標準物質(α -BNP溶液; 0、4、10、150、600、2000 pg/ml)をポリスチレン製の試験管に100 μ l分注し、200 μ lのヨウ化BNP抗体(125 I)溶液を添加し、BC203抗体固相化ポリスチレンビーズを1個加えて攪拌後、4℃で18時間反応した。2mlの洗浄液で2回洗浄を行った後、放射活性を γ カウンターARC-600(アロカ社製)で測定した。その結果を図1及び図2に示す。

【0019】

4) γ -BNP測定系による血漿画分の測定

γ -BNPの測定は上記2)で作製した γ -hBNPアミノ末端部分(27-64)に対する抗体を 125 Iで標識した抗体、及び α -BNPカルボキシ末端認識抗体(BC203)を固相したポリスチレンビーズを用いてサンドイッチIRMA法で行った。

各測定検体をポリスチレン製の試験管に100 μ l分注し、200 μ lの0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5、0.3M、5mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、0.2%BSA、500KIU/l牛肺由来アプロチニン(シグマ社製)を添加し、BC203抗体固相ポリスチレンビーズを1個加えて攪拌後、4℃で18時間反応した。2mlの洗浄液で2回で洗浄を行った後、 125 I標識抗体溶液300 μ lを加えて攪拌し、4℃で18時間反応した。2mlの洗浄液で2回洗浄を行った後、放射活性を γ カウンターARC-600(アロカ社製)で測定した。その結果を図3に示す。

【0020】

(3) 結果

患者血漿のゲルろ過HPLCによるクロマトグラムの測定結果は図1、図2及

び図3に示されている。これらの図においてAは α -BNPの溶出位置である。

図1は、上記(2)の3)の α -BNP測定キットによる測定結果を示している。図中、縦軸は各分画中のシオノリアBNPで測定したBNP様物質の濃度、横軸はカラムからの溶出容量を表す。黒三角、白四角及び白菱形はそれぞれ異なる血漿検体の測定結果を示している。

図2は、図1と異なる検体を用いて、上記(2)の3)の α -BNP測定系で測定した結果を示している。図中、縦軸は各分画中のシオノリアBNPで測定したBNP様物質の濃度、横軸はカラムからの溶出容量を表す。また、黒三角及び黒四角は異なる血漿検体を示す。

図3は、図2と同じ検体を用いて上記(2)の4)に記載の本発明の γ -BNP測定系による測定結果を示し、縦軸は本発明の γ -BNP免疫測定系で測定した放射活性を、横軸はカラムからの溶出容量を表している。また、黒丸は α -BNPを示す。

図1及び図2から、心疾患患者血漿中には α -BNPよりも分子量の大きなBNP免疫活性様の物質が存在し、それがBNP免疫活性をもつ主要物質であることが分かる。

また、図3から、本発明の γ -BNP特異的免疫測定法では、BNP免疫活性をもつ主要物質を検出することができるが、 α -BNPは全く検出されないことが分かる。

以上の結果は、本発明の γ -BNP免疫測定法は α -BNPを認識せず、 γ -BNPに特異的な方法であることを示している。また、BNP免疫活性をもつ主要物質が γ -BNPであることも明らかとなった。

【0021】

試験例1 γ -BNP及び α -BNPの血漿中での安定性

上記実施例1における心疾患患者由来の血漿検体のゲルろ過HPLCの結果から、 γ -BNPを含むと思われる分画を採取し、健常人ボランティアから得た牛肺由来アプロチニンを含まない血漿(α -BNP最小検出限界(4 pg/ml)未満)に添加後、室温(25℃)にて0、2、6、24時間放置し、BNP免疫活性をシオノリアBNPキットで測定し、 γ -BNPの安定性を調べた。

一方、上記と同様の牛肺由来のアプロチニンを含まない健常人ボランティア血漿に化学的に合成した α -BNPを添加後、4℃で0、2、6、24時間放置し、BNP免疫活性をシオノリアBNPキットで測定し、 α -BNPの安定性を調べた。

γ -BNP及び α -BNPの血漿検体中での免疫活性の安定性の結果を図4及び図5に示す。

図4から、 γ -BNPは25℃で24時間放置した場合、初期値の免疫活性に比較して有意な低下は見られないのに対し、図5から、 α -BNPは4℃で24時間放置した場合、初期値の約40%にまで免疫活性が低下することが分かる。

以上から、 α -BNPは γ -BNPよりも血液中で著しく不安定であり、心疾患の診断には、後者が適することが明らかである。

【0022】

【発明の効果】

本発明の γ -BNP特異的免疫測定法によれば、安定な γ -BNP誘導体を特異的に測定することから、測定検体の採取法、保存法、並びに測定までの時間による影響を受けることなく安定な信頼性ある臨床データが得られる。しかも採血試料に特別な処理を施すことなく、測定することができるので、簡便に安定な信頼性ある臨床データを提供し、心疾患の正確な診断に貢献し得る。

【 0 0 2 3 】

【配列表】

【0024】

配列番号：1

配列の長さ : 1 3 4

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：ヒト

配列

ATG GAT CCC CAG ACA GCA CCT TCC CGC GCG CTC CTG CTC CTG CTC TTC 48

Met Asp Pro Gln Thr Ala Pro Ser Arg Ala Leu Leu Leu Leu Leu Phe

1 5 10 15

TTG CAT CTG GCT TTC CTG GGA GGT CGT TCC CAC CCG CTG GGC AGC CCC 96

Leu His Leu Ala Phe Lue Gly Gly Arg Ser His Pro Leu Gly Ser Pro

20 25 30

GGT TCA GCC TCG GAC TTG GAA ACG TCC GGG TTA CAG GAG CAG CGC AAC 144

Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn

35 40 45

CAT TTG CAG GGC AAA CTG TCG GAG CTG CAG GTG GAC CAG ACA TCC CTG 196

His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu

50 55 60

GAG CCC CTC CAG GAG AGC CCC CGT CCC ACA GGT GTC TGG AAG TCC CGG 244

Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg

65 70 75 80

GAG GTA GCC ACC GAG GGC ATC CGT GGG CAC CGC AAA ATG GTC CTC TAC 292

Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Try

85 90 95

ACC CTG CGG GCA CCA CGA AGC CCC AAG ATG GTG CAA GGG TCT GGC TGC 340

Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys

100

105

110

TTT GGG AGG AAG ATG GAC CGG ATC AGC TCC TCC AGT GCC CTG GGC TGC 388

Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys

115

120

125

AAA GTG CTG AGG CGG CAT

436

Lys Val Leu Arg Arg His

130

134

【図面の簡単な説明】

【図1】 α -BNP測定系で測定した、血漿検体の Superdex 75によるゲルろ過HPLCでのクロマトグラム。

【図2】 α -BNP測定系で測定した、図2と同じ血漿検体の Superdex 75によるゲルろ過HPLCでのクロマトグラム。

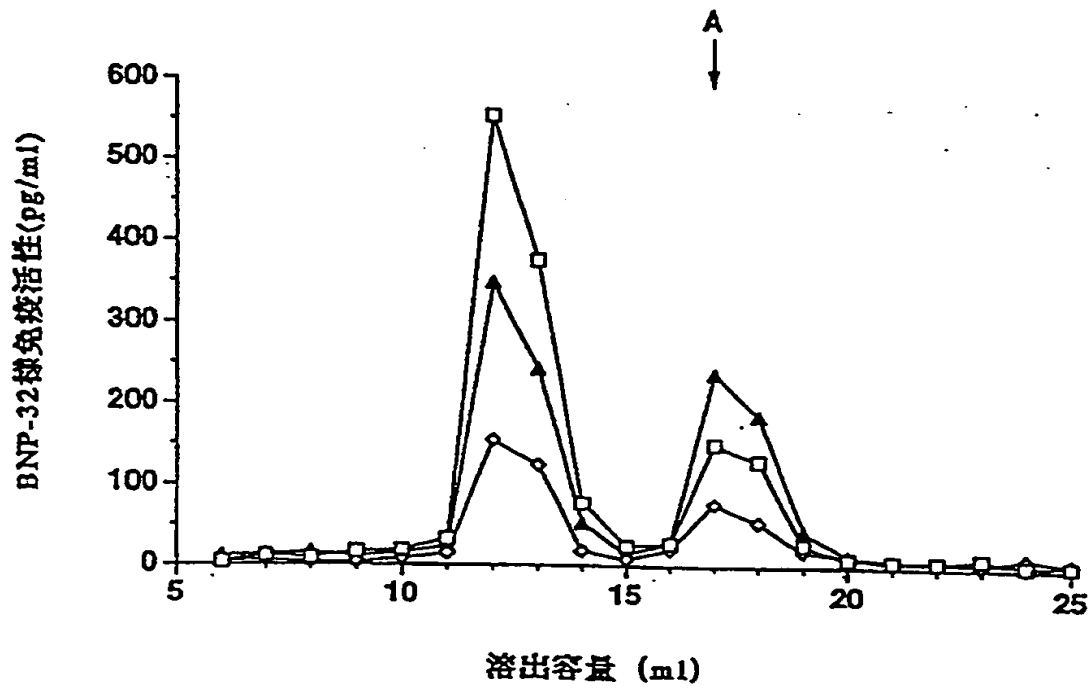
【図3】 γ -BNP特異的免疫測定法で測定した、血漿検体の Superdex 75によるゲルろ過HPLCでのクロマトグラム。

【図4】 γ -BNPをヒト血漿中、25℃で保存したときの保存時間と、BNPの免疫活性との関係を示すグラフ。

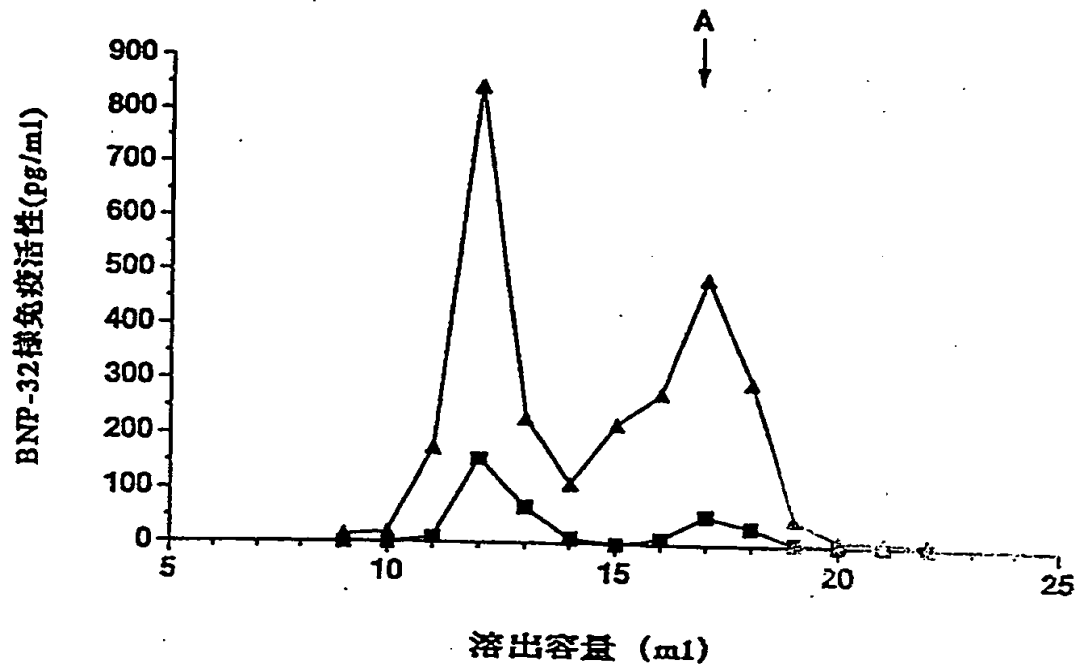
【図5】 α -BNPをヒト血漿中、4℃で保存した時の保存時間と、 α -BNPの免疫活性との関係を示すグラフ。

【書類名】 図面

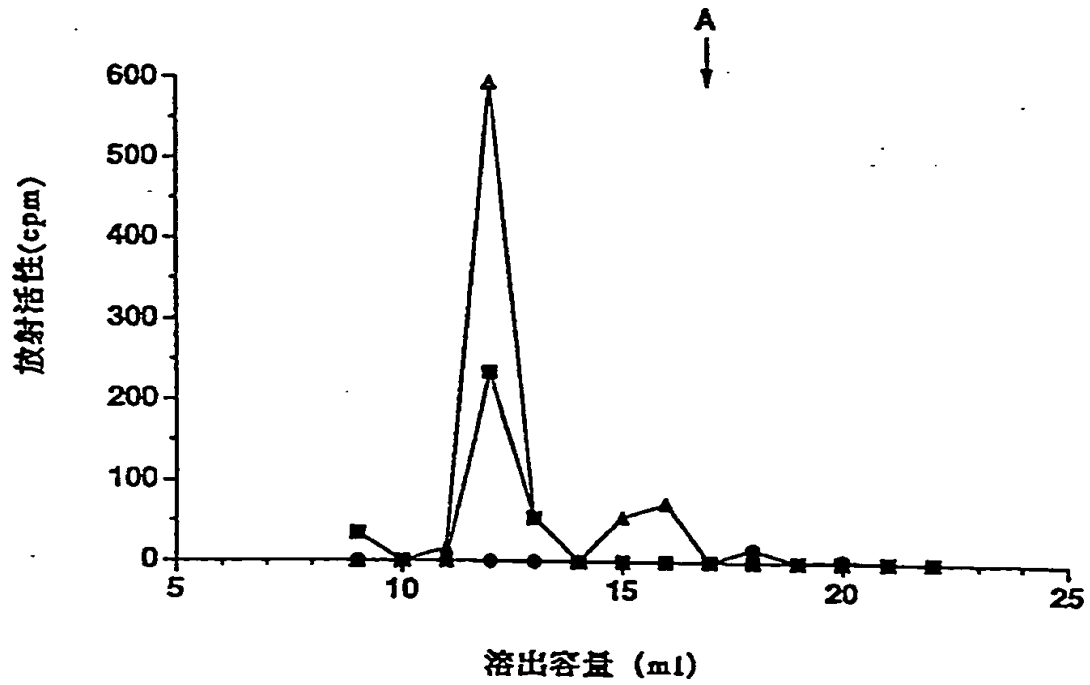
【図1】



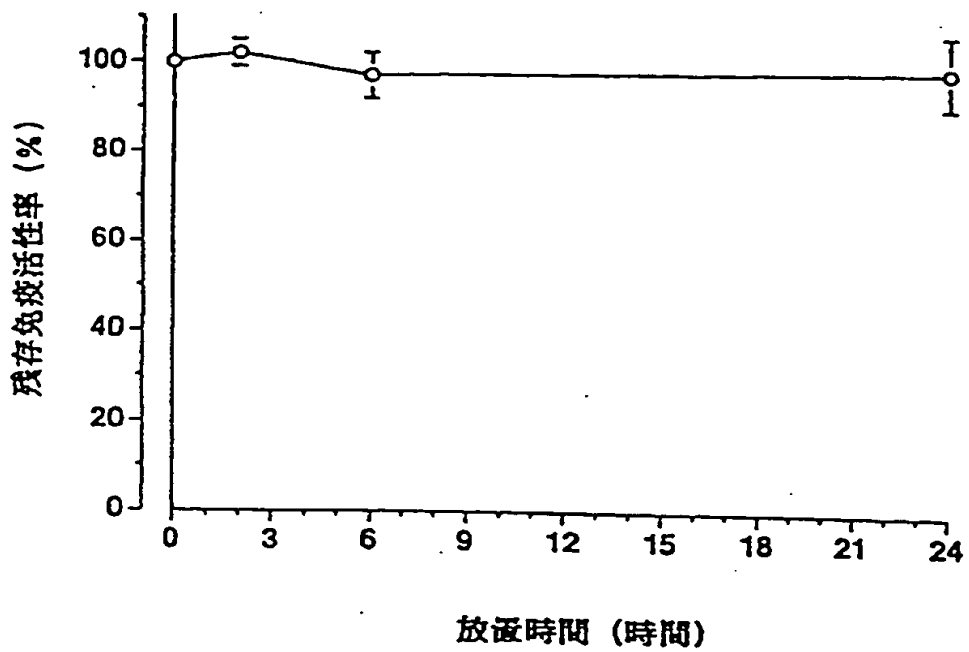
【図2】



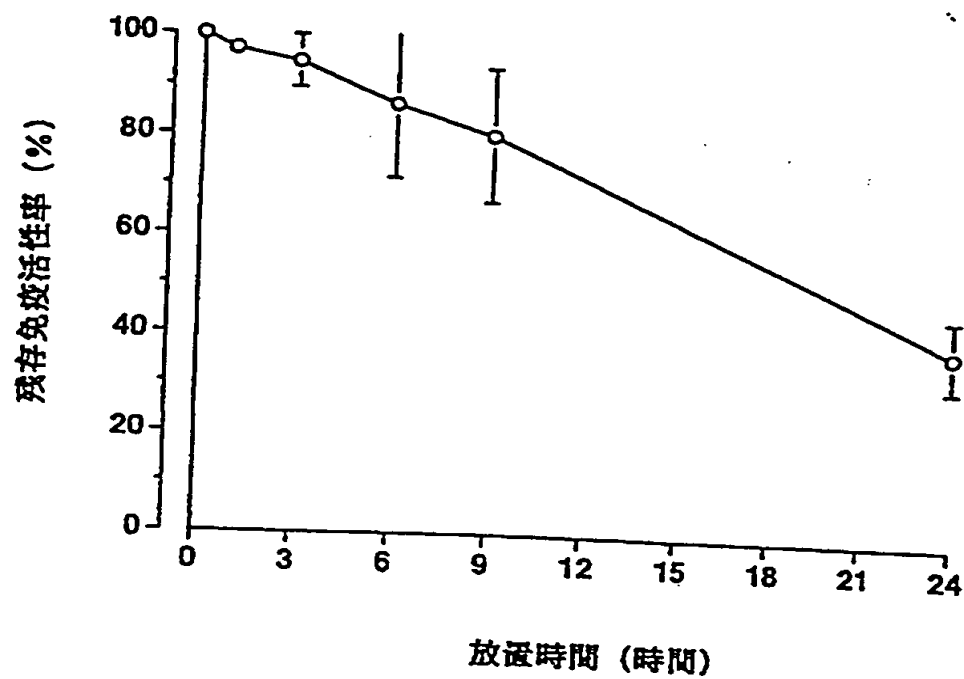
【図3】



【図4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 BNPのより正確な免疫測定法の開発。

【解決手段】 哺乳類のBNP誘導体に特異的な免疫測定法であって、該誘導体に反応する抗体のうち、 γ -BNPもしくはプレプロBNPを、そのプロセッシングシグナル配列のカルボキシ末端で切断することにより生成されるナトリウム利尿活性を有する低分子量の α -BNPに反応する第1の抗体と、反応しない第2の抗体とを用い、少なくとも一方が検出可能に標識されていることを特徴とする方法。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000001926

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号

【氏名又は名称】

塩野義製薬株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100062144

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所

【氏名又は名称】

青山 葆

【選任した代理人】

【識別番号】

100068526

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所

【氏名又は名称】

田村 恭生

【選任した代理人】

【識別番号】

100087114

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所

【氏名又は名称】

齋藤 みの里

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001926]

1. 変更年月日 1990年 8月23日
[変更理由] 新規登録
住 所 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号
氏 名 塩野義製薬株式会社